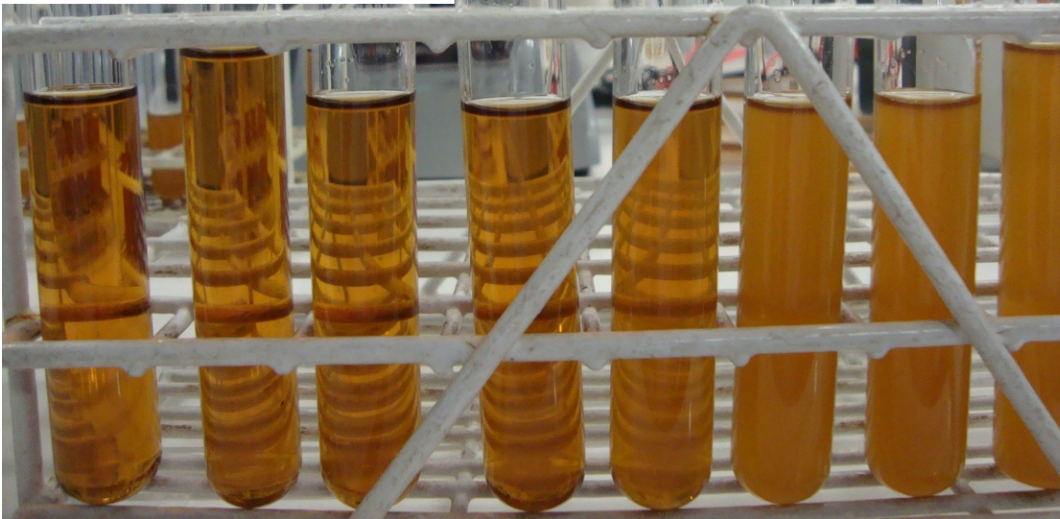
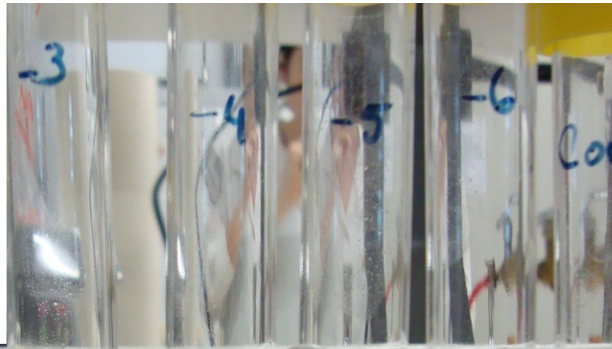
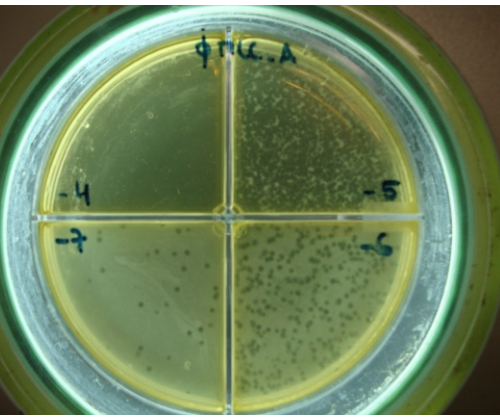


Bacteriófagos no Ambiente de Processamento de Leite



ISSN 2179-8184

Abril, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 137

Bacteriófagos no Ambiente de Processamento do Leite

*Laura Maria Bruno
Cristiane Pereira de Lima*

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici

CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Fone: (85) 3391-7100

Fax: (85) 3391-7109

Home page: www.cnpat.embrapa.br

E-mail: vendas@cnpat.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior*

Secretário-Executivo: *Marco Aurélio da Rocha Melo*

Membros: *Diva Correia, Marlon Vagner Valentim Martins, Arthur Cláudio Rodrigues de Souza, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Adriano Lincoln Albuquerque Mattos e Carlos Farley Herbster Moura*

Supervisão editorial: *Marco Aurélio da Rocha Melo*

Revisão de texto: *Lucas Almeida Carneiro*

Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

Foto(s) da capa: Cristiane Pereira de Lima

1ª edição (2011): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da Unidade catalogadora

Bruno, Laura Maria.

Bacteriófagos no ambiente de processamento do leite / Laura Maria Bruno, Cristiane Pereira de Lima. – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

22 p. 21 cm. – (Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 2179-8184, 137).

1. Bactérias lácticas. 2. Fermentação láctica. 3. Produtos lácticos fermentados. I. Lima, Cristiane Pereira de. II. Título. III. Série.

CDD 579.26

Autores

Laura Maria Bruno

Engenheira de alimentos, D. Sc. em Ciências biológicas, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici, CEP 60511-110 Fortaleza, CE, Imbruno@cnpat.embrapa.br

Cristiane Pereira de Lima

Engenheira de alimentos, M. Sc. em Tecnologia de alimentos pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Av. Mister Hull, 2977, Pici, CEP 60021-970 Fortaleza, CE, cristiane.pereira@hotmail.com

Apresentação

A busca de novos micro-organismos que possuam boas propriedades tecnológicas para a fabricação de produtos lácteos fermentados é um interesse e necessidade constante no desenvolvimento do agronegócio do leite.

Dentre as características tecnológicas desejáveis na seleção de novas cepas, podem ser citadas: viabilidade da cepa, manutenção de suas características desejáveis, como, por exemplo, crescimento em meio ácido durante o processamento e estocagem e resistência a bacteriófagos ou fagos, que são vírus que infectam bactérias.

A seleção de cepas resistentes a bacteriófagos representa um sério desafio na produção de produtos lácteos fermentados, uma vez que o ataque de fagos nos laticínios altera todo o processo fermentativo, podendo, inclusive, ocasionar o seu colapso e, conseqüentemente, grandes perdas econômicas.

A Embrapa Agroindústria Tropical, ciente da relevância do estudo de organismos associados à produção de alimentos e, em particular, da importância da característica de resistência a bacteriófagos na seleção de micro-organismos para a produção de derivados de leite, pretende com esta publicação, oferecer a estudantes e profissionais uma revisão atualizada sobre a importância dos fagos de bactérias ácido-láticas e a consequência de sua presença no ambiente de processamento do leite.

Vitor Hugo de Oliveira

Chefe-Geral da Embrapa Agroindústria Tropical

Sumário

Introdução.....	9
Bacteriófagos	10
Problemas associados à presença de bacteriófagos na indústria de laticínios	11
Alternativas para o controle de bacteriófagos.....	14
Seleção de cepas resistentes a bacteriófagos	16
Considerações.....	19
Referências	21

Bacteriófagos no Ambiente de Processamento do Leite

Laura Maria Bruno

Cristiane Pereira de Lima

Introdução

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias. Os fagos são bactéria-específicos, de tal forma que um determinado fago para uma dada bactéria é incapaz de atacar outras bactérias (HAGENS; OFFERHAUS, 2008).

Em 1935, Whitehead e Cox, citados por Moineau et al. (1996), foram os primeiros a relatar que a redução da atividade metabólica de culturas iniciadoras de *Lactococcus lactis* para queijos era devida à atuação de bacteriófagos. Desde então, a incidência de fagos de bactérias ácido-láticas nos laticínios e seus efeitos sobre a capacidade acidificante das culturas lácticas têm sido estudados.

A presença de bacteriófagos na indústria de produtos lácteos fermentados é uma ameaça aos seus processos tecnológicos. Em geral, a multiplicação de fagos conduz à diminuição da capacidade de produzir ácido pela cultura. Isso, em termos comerciais, pode levar desde a ruptura da escala de produção, redução da qualidade do produto e de seu valor comercial até, em casos mais severos, ao abandono da produção, o que acarreta sempre em grandes perdas econômicas.

Portanto, a resistência das bactérias ácido-láticas à infecção por bacteriófagos é um dos principais aspectos a ser considerado na

pesquisa e seleção de novas cepas a serem empregadas na elaboração de produtos lácteos fermentados.

Este trabalho de revisão tem como objetivos apresentar a problemática da proliferação de bacteriófagos na indústria de laticínios, formas de minimizá-lo e, ainda, expor os fundamentos que devem ser empregados na análise da presença da característica de resistência a fagos em bactérias ácido-láticas.

Bacteriófagos

Bacteriófagos, ou fagos, são agentes patogênicos virais específicos que atacam e matam bactérias. O termo bacteriófago vem da tradução grega para “vírus que pode infectar bactérias”, sendo a tradução literal “comedor de bactérias” (NEVE; TEUBER, 1991).

Assim como os vírus de animais e de plantas, os fagos possuem duas condições de vida. No estado extracelular são partículas submicroscópicas, metabolicamente inertes, contendo ácido nucleico cercado por proteína e, ocasionalmente, outros componentes macromoleculares. Essa estrutura é denominada *vírion* e apresenta a capacidade de transmitir o genoma viral da célula hospedeira, na qual ela foi produzida, para outra célula, na qual o seu material genético será introduzido, iniciando o estado intracelular (MANDIGAN et al., 2008).

No interior da célula hospedeira, os fagos desviam o metabolismo bacteriano, que deixa de produzir os componentes celulares e passa a sintetizar partículas fágicas, gerando uma nova progênie de fagos, que é liberada no ambiente após a lise da bactéria (NEVE; TEUBER, 1991).

De acordo com o ciclo de vida, os bacteriófagos podem ser diferenciados em líticos e temperados, sendo estes últimos chamados também de lisogênicos. Os líticos, após a infecção e multiplicação, promovem lise bacteriana, causando a destruição celular. Os lisogênicos integram-se de maneira estável ao genoma do cromossomo da célula hospedeira e, neste estágio, são chamados de profagos.

O DNA do profago é fielmente copiado durante a replicação do cromossomo da célula hospedeira e transmitido a toda sua progênie (McGRATH et al., 2004).

De acordo com MANDIGAN et al. (2008), o processo de replicação viral pode ser caracterizado pelas seguintes etapas:

- Ligação ou adsorção do *vírião* a célula hospedeira susceptível.
- Penetração (injeção) do *vírião* ou de seu ácido nucleico na célula.
- Síntese de ácidos nucleicos e de proteínas, que ocorre desde os estágios precoces até os tardios, durante a infecção.
- Montagem das subunidades estruturais (e dos componentes de membrana, no caso de vírus envelopados) e empacotamento do ácido nucleico, originando novas partículas virais.
- Liberação dos *vírions* maduros pela célula.

A multiplicação do fago ocorre no interior da célula à custa do metabolismo bacteriano, usando os recursos energéticos e materiais (elementos de ácido nucleico e de proteínas) do hospedeiro.

O período de tempo decorrido desde a infecção até a liberação da nova progênie fágica é chamado de período de latência. Tanto o período de latência, quanto o número médio de partículas de fagos geradas por uma célula bacteriana dependem do tipo de fago, do hospedeiro, do estado fisiológico do hospedeiro e da composição e temperatura do meio de crescimento (MÜLLER-MERBACH et al., 2007). Para muitos vírus de bactérias, a duração de um ciclo completo varia de 20 a 60 minutos (MANDIGAN et al., 2008).

Problemas associados à presença de bacteriófagos na indústria de laticínios

Os primeiros estudos sobre fagos de bactérias lácticas foram voltados para os fagos de *Lactococcus* e forneceram dados sobre suas características morfológicas, sorológicas e fisiológicas (SCHOULER,

1996). Atualmente, esses fagos são classificados em dez grupos, morfológica e geneticamente distintos, baseados principalmente em técnicas de hibridizações DNA-DNA, microscopia eletrônica e análises comparativas de genomas (DEVEAU et al., 2006). No entanto, fagos pertencentes a apenas três desses grupos, 936, c2 e P335, têm sido os mais estudados, uma vez que eles são os principais causadores das falhas nas fermentações lácticas (VILLION et al., 2009).

Embora os fagos de *Lactococcus* sejam bastante estudados (HUSSAIN et al., 2008; MIKLIC; ROGELJ, 2003; SUÁREZ et al., 2008), a presença de bacteriófagos de *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus* e *Leuconostoc* também tem sido relatada (HILL, 1993; KILIÇ et al., 1996; QUIBERONI et al., 2003). Villion e Moineau (2009) compilaram uma lista de fagos de *Lactobacillus* relatados em artigos desde 1960 e identificaram 231 bacteriófagos de lactobacilos. Desse total, 186 fagos haviam sido estudados por microscopia eletrônica e foram classificados nas famílias *Siphoviridae* (109), *Myoviridae* (76) e *Podoviridae* (1).

Na literatura, há um menor número de relatos de infecções de bacteriófagos em culturas de *Streptococcus thermophilus*. Suárez et al. (2002) encontraram 59 fagos parasitas dessa espécie de bactéria ácido-lática, sendo que as cepas comerciais propagaram maior quantidade de fagos do que as selvagens. Quiberoni et al. (2003), na Argentina, isolaram onze fagos líticos de *S. thermophilus* de bateladas de fabricação de iogurte com problemas de acidificação.

A problemática dos fagos de bactérias ácido-láticas está relacionada com a grande importância tecnológica desses micro-organismos para a indústria de laticínios, pois eles são usados como culturas iniciadoras ou adjuntas na elaboração dos mais diversos produtos. A bactéria *Lactococcus lactis*, por exemplo, é usada como cultura iniciadora na fabricação de diferentes tipos de queijos, dentre outros produtos lácteos (del RIO et al., 2007). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* compõe as culturas comerciais para fabricação de iogurte, enquanto que *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* é uma das principais cepas presentes em culturas de soro empregadas na produção de queijos

duros argentinos e italianos (GUGLIELMOTTI et al., 2006). Já as cepas de *S. thermophilus* são utilizadas na produção de iogurtes, de leites fermentados e de queijos como Cuartirolo, Port Salut, Fontina e Edam (QUIBERONI et al., 2003).

A função mais importante das bactérias ácido-láticas é a acidificação que elas promovem no leite. O acúmulo de ácido, além de modificar as propriedades reológicas e organolépticas do produto, também promove uma maior conservação do alimento, devido à diminuição do seu pH (MADERA et al., 2003). Como as infecções fágicas afetam o metabolismo bacteriano, elas provocam uma demora parcial ou total na atividade acidificante das culturas lácticas iniciadoras, sendo, então, consideradas um sério problema para os processos lácticos fermentativos (GUGLIELMOTTI et al., 2006).

A susceptibilidade das bactérias lácticas ao ataque de bacteriófagos está relacionada inicialmente ao próprio material de partida das fermentações, principalmente o leite cru, que não é estéril. Ademais, o processo de pasteurização não é, em geral, adequado para desativar as partículas virais presentes no leite (BINETTI et al., 2008). Soma-se a isso o uso continuado de uma mesma cultura láctica iniciadora, a qual fornece um hospedeiro constante para a proliferação de fagos (del RIO et al., 2007; ALLISON; KLAENHAMMER, 1998).

Entre os processos fermentativos, a produção de queijos é a mais sensível à infecção de fagos, pois envolve o uso de fermentação em tanques abertos, tratamento térmico brando e grande manipulação do produto. Suárez et al. (2002), ao isolarem fagos de produtos lácteos argentinos, detectaram maior quantidade de fagos (79%) em amostras de queijos.

A multiplicação de fagos durante a fabricação de queijos leva a uma diminuição da habilidade de produzir ácido da cultura, reduzindo, conseqüentemente, a expulsão do soro (sinérese) da coalhada, e, em casos extremos, promove a completa inibição da produção de ácido – ou “morte” – do tanque de coagulação. Fagos também podem infectar

e se multiplicar na própria cultura, que é um problema mais sério do que a contaminação durante o processamento. As consequências finais do retardamento da produção de ácido são um aumento na umidade dos queijos e uma maior propensão ao desenvolvimento de aromas indesejáveis (COGAN et al., 1991). Em termos comerciais, as consequências de uma infecção por fagos incluem: ruptura da escala de produção, redução da qualidade do produto e de seu valor comercial e, em casos mais severos, o abandono da produção (McGRATH et al., 2004).

Alternativas para o controle de bacteriófagos

Sabe-se que bacteriófagos estão sempre presentes, em número variável, no ambiente de processamento (SUÁREZ et al., 2002). Por causa disso, a permanente monitoração e manutenção do nível de fagos em valores menores que 10^5 UFP – Unidades Formadoras de Placa/mL são essenciais para não causarem problemas de acidificação do leite nos processos fermentativos (SUÁREZ et al., 2002; SVENSSON; CHRISTIANSSON, 1991).

Tradicionalmente o controle de fagos pode ser realizado com o uso de um sistema de rotação de culturas, no qual culturas que não são atacadas pelo mesmo fago são usadas sucessivamente (COGAN et al., 1991). Outros métodos para o controle de fagos como incorporação de tanques fechados, desinfecção regular do equipamento, inoculação direta no tanque, propagação das culturas iniciadoras em meio inibitório para fagos e aplicação de culturas iniciadoras de espécies múltiplas resistentes a fagos também têm sido implementados pela indústria de laticínios (ALISSON; KLAENHAMMER, 1998).

Segundo McGrath et al. (2004), as plantas dos laticínios modernos são especificamente desenhadas para reduzir a incidência da infecção fágica. De acordo com esses autores, nessas fábricas são adotados os seguintes procedimentos:

- Separação física entre a área de preparo do fermento láctico e a área de produção, com acesso restrito de pessoal para evitar a contaminação cruzada.

- Manutenção de pressão positiva na sala de preparo do fermento para evitar a entrada de fagos de outros ambientes.

McGrath et al. (2004) ainda recomendam medidas adicionais que incluem o aquecimento do meio de cultivo da cultura iniciadora a temperaturas iguais ou superiores a 90°C por, no mínimo, 20 minutos e filtração do ar de resfriamento utilizando filtros de alta eficiência, como os filtros HEPA – *High Efficiency Particulate Air*, que são filtros de partículas aéreas de alta eficiência.

A etapa de propagação do fermento láctico oferece oportunidades para a multiplicação de fagos, e deve ser cercada de cuidados. A propagação das culturas lácticas deve ser realizada em meios inibitórios para fagos (HASSAN; FRANK, 2001; McGRATH et al., 2004). Como exemplo, têm-se os meios adicionados de fosfato e citrato, que quelam íons cálcio, necessários à adsorção do fago à célula hospedeira (HASSAN; FRANK, 2001; McGRATH et al., 2004) .

Como nem todos os bacteriófagos são inibidos pela ausência de cálcio, é bom ressaltar que o uso de meios inibitórios para fagos é apenas uma das estratégias que devem ser utilizadas no controle (HASSAN e FRANK, 2001). O fechamento dos tanques de fermentação durante o preparo do fermento láctico; a remoção do soro da sala de produção através de sistema fechado, uma vez que o soro é uma grande fonte de fagos; a sanitização através de sistema CIP – *Cleaning in Place* – ou desinfecção a frio dos tanques com cloro e ácido peracético; e o uso de culturas resistentes a fagos são, também, procedimentos que devem ser adotados (EVERSON, 1991).

De acordo com Everson (1991), a única maneira de prevenção total das infecções fágicas é a completa esterilização de todo o sistema (meio, tanques, ar) envolvido na produção. No entanto, produtos lácteos não podem ser aquecidos a altas temperaturas sem que haja comprometimento do sabor e problemas de instabilidade da coalhada, devido a interações entre as proteínas desnaturadas do soro e a caseína. Assim, novamente enfatiza-se que uma forma

viável e essencial de controle de infecções por bacteriófagos é o monitoramento do número de fagos, que deve ser mantido em níveis inferiores a 10^5 UFP/ml para não causarem problemas de acidificação no processamento do leite (SUÁREZ et al., 2002).

Seleção de cepas resistentes a bacteriófagos

Embora os avanços tecnológicos e emprego de estratégias de controle de fagos junto aos processos fermentativos tenham reduzido a incidência de infecção fágica, ela não foi eliminada, levando pesquisadores a buscar cepas de culturas láticas resistentes a fagos para serem usadas na forma concentrada, inoculadas diretamente no leite (McGRATH et al., 2004).

Uma fonte conveniente para a seleção de tais bactérias são as pequenas fábricas que produzem queijos artesanais, sem adição de qualquer fermento lático, pois nessa situação a coagulação do leite depende exclusivamente da microbiota lática endógena presente no leite cru ou no ambiente do processamento. O fundamento lógico disto é que estas bactérias provavelmente foram submetidas a uma forte seleção para uma boa coagulação do leite e para a resistência a bacteriófagos (MADERA et al., 2003).

A ocorrência natural de resistência a bacteriófagos foi identificada em algumas cepas de *Lactococcus* selvagens. O sistema que promove a característica de resistência está codificado em plasmídeos e engloba uma diversidade de métodos que interferem com o desenvolvimento dos fagos em vários pontos do ciclo de infecção, entre os quais: prevenção da adsorção do fago; inibição da injeção de DNA, replicação e transcrição; restrição do DNA fágico; e interferência na síntese de proteínas dos fagos, formação da partícula, lise da bactéria e liberação da progênie (ALLISON; KLAENHAMMER, 1998).

O conhecimento sobre fagos, sua genética, como eles interagem com o hospedeiro e como se adaptam para transpor as defesas do hospedeiro pode ser utilizado para alterar geneticamente cepas com a finalidade

de introduzir plasmídeos que codifiquem para a resistência a fagos (ALLISON; KLAENHAMMER, 1998; HASSAN; FRANK, 2001).

No entanto, fagos possuem a capacidade de adotar estratégias genéticas para contornar os mecanismos de resistência de seus hospedeiros, fazendo com que novas cepas com boas propriedades tecnológicas e que sejam resistentes a uma significativa faixa de fagos prevalentes na indústria seja sempre necessária (MADERA et al., 2003).

Bactérias ácido-láticas isoladas de ambientes de produção artesanal podem ser avaliadas contra fagos provenientes de processos fermentativos fracassados. Madera et al. (2003) isolaram cem cepas de *Lactococcus lactis* de fermentações lácteas espontâneas e encontraram 33 bactérias resistentes a 34 diferentes fagos, pertencentes aos grupos c2 e 936, da Coleção Christian Hanssen. Os fagos utilizados haviam sido isolados de fermentações mal sucedidas na Europa e Estados Unidos.

Lima (2010) avaliou a resistência de onze cepas de *Lactobacillus paracasei* selvagens, provenientes de queijos de coalho produzidos artesanalmente e comercializados no estado do Ceará, contra oito bacteriófagos pertencentes à Coleção do *Instituto de Lactologia Industrial* – INLAIN, Santa Fé, Argentina, e verificaram que todas as cepas foram resistentes aos fagos testados.

A avaliação da resistência de cepas de bactérias ácido-láticas a bacteriófagos envolve desde o isolamento dos fagos até a avaliação do crescimento bacteriano em presença do vírus. O isolamento de fagos se inicia com a preparação do filtrado da amostra suspeita de conter o bacteriófago. A amostra pode ser líquida (leite, iogurte, soro, cultura iniciadora), em pó, como o leite em pó, ou sólida, no caso de queijos. Essas amostras têm seu pH ajustado assepticamente para pH 4,5 - 4,7, sendo em seguida centrifugadas e filtradas para remoção de partículas grandes. O filtrado é então refiltrado em membrana de 0,45µm e o filtrado livre de bactérias é usado nos demais ensaios (SVENSSON; CHRISTIANSSON, 1991). De acordo com Svensson e Christiansson

(1991) as amostras líquidas são diretamente utilizadas, mas as amostras de leite em pó e de queijo devem ser adequadamente diluídas antes de terem o seu pH ajustado. Os autores ainda recomendam que para diferenciar o efeito dos bacteriófagos de efeitos de outros agentes inibidores, uma parte do filtrado deverá ser tratada termicamente a 90°C por 15 minutos, pois esse aquecimento inativa os bacteriófagos, mas não tem efeito sobre outros agentes inibidores, como, por exemplo, os antibióticos.

Um dos testes utilizados para a detecção de bacteriófagos é o teste de atividade do IDF – *International Dairy Federation*. Nesse método, a inibição da amostra contendo o bacteriófago é medida como um decréscimo na produção de ácido (comparado com uma amostra controle livre de fago) por uma cultura iniciadora em leite estéril, evaporado ou pasteurizado (SVENSSON; CHRISTIANSSON, 1991). A descrição detalhada dessa metodologia é dada por Svensson e Christiansson (1991), para culturas mesofílicas.

Outro teste bastante utilizado na detecção de bacteriófagos é o teste de turbidez. Nessa metodologia, a cultura é adicionada ao meio de cultura adequado (por exemplo, caldo MRS contendo CaCl_2 10mM, no caso de *Lactobacillus*) adicionado ou não (controle) do filtrado suspeito de conter fagos, e incubada na temperatura adequada para o cultivo da bactéria. O crescimento da cultura é acompanhado durante intervalos regulares de tempo até a fase estacionária pela leitura da absorbância (580-600nm) em espectrofotômetro. Se a cultura inoculada com o filtrado alcançar o mesmo crescimento do controle, ela é considerada resistente ao fago testado. Esse método só pode ser usado para uma única cultura, mas é adequado tanto para bactérias produtoras de ácido, como para as produtoras de sabor e aroma (SVENSSON; CHRISTIANSSON, 1991).

Capra (2007) alerta para que, se não houver lise do cultivo adicionado do filtrado suspeito de fagos, ou seja, se não houver diferença de turbidez entre o tubo controle e o tubo com o fago após a primeira incubação, o procedimento deverá ser repetido mais duas vezes,

em dois dias consecutivos, partindo do tubo correspondente do dia anterior, mantendo-se o monitoramento da turbidez. Isso permite distinguir a natureza do agente inibidor, pois, se no filtrado existir uma inibição do tipo química, seu efeito seria decrescente nos sucessivos repiques, por diluição da substância, e resultaria no crescimento celular quando a concentração do inibidor diminuísse o suficiente. Já no caso da inibição por fagos, os sucessivos repiques permitiriam a sua propagação, produzindo a lise da bactéria.

O teste de turbidez também pode ser usado na avaliação da resistência de bactérias ácido-láticas a um determinado fago, por exemplo, dos fagos de referência, mantidos em coleções. No entanto, Capra (2007) recomenda que os fagos sejam propagados até o título de 10^9 UFP/ml, antes de serem utilizados nos testes de turbidez.

Considerações finais

Pelo exposto, fica evidente que a proliferação de bacteriófagos nos laticínios está associada sempre a perdas econômicas, pois a sua principal consequência é a interrupção do processo fermentativo. Como os fagos estão presentes no leite, que é um insumo fundamental na fermentação, um rigoroso controle do seu número e medidas preventivas que evitem a sua multiplicação precisam ser empregados durante todo o processamento.

Outro aspecto importante, considerando-se a seleção e desenvolvimento de novas cepas para serem utilizadas como culturas iniciadoras ou adjuntas na fabricação de produtos lácteos, refere-se à necessidade de investigação da resistência dessas bactérias selvagens à infecção por bacteriófagos. Esse tipo de avaliação, aliado ao estudo de características tecnológicas, como, por exemplo, capacidade de produzir ácido, aroma, e tolerância a sal, é determinante na definição de novas cepas resistentes a fagos, que desempenhem sua função por período de tempo prolongado, e que possam ser adequadamente empregadas na composição de um fermento láctico.

Referências

ALISSON, G. E.; KLAENHAMMER, T. R. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 207-226, 1998.

BINETTI, A. G.; CAPRA, M. L.; ÁLVAREZ, M. A.; REINHEIMER, J. A. PCR method for detection and identification of *Lactobacillus casei/paracasei* bacteriophages in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 147-153, 2008.

CAPRA, M. L. **Bacteriofagos de *Lactobacillus casei/paracasei*. Caracterización y estudio de la fagorresistencia.** 2007. 229f. Tese (Doctor em Ciencias Biológicas) Instituto de Lactología Industrial, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

COGAN, T. M.; PEITERSEN, N.; SELLARS, R. L. Starter Systems. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 263, p. 16-23, 1991.

del RIO, B; BINETTI, A. G.; MARTÍN, M. C.; FERNÁNDEZ, M.; MAGADADÁN, A.H.; ÁLVAREZ, M. A. Multiplex PCR for detection and identification of dairy bacteriophages in milk. **Food Microbiology**, v. 24, p. 75-81, 2007.

DEVEAU, H.; LABRIE, S. J.; CHOPIN, M-C.; MOINEAU, S. Biodiversity and classification of lactococcal phages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p. 4338-4346, 2006.

EVERSON, T. C. Control of phage in the dairy plant. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 263, p. 24-28, 1991.

GUGLIELMOTTI, D. M.; REINHEIMER, J. A.; BINETTI, A. G.; GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; QUIBERONI, A. Characterization of spontaneous phage-resistant derivatives of

Lactobacillus delbruekii commercial strains. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p. 126-133, 2006.

HAGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages – new weapons for food safety. **Food Technology**, v.62, n. 4, p. 46-54, 2008.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. (Ed.). **Applied dairy microbiology**, 2. ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HILL, C. Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p. 87-108, 1993.

HUSSAIN, K.; MASUD, T.; MAQSUD, S.; MAHMOOD, T. Characterization of *Lactococcus* phages from dahi whey. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7, p. 689–694, 2008.

KILIÇ, A.O.; PAVLOVA, S.I.; MA, W; TAO, L. Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in american dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.6, p. 2111–2116, 1996.

LIMA, C. P. Resistência de bactérias lácticas a bacteriófagos isolados na produção de queijos de coalho no Ceará. 2010. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANSEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J.E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 213-222, 2003.

MANDIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Fundamentos de Virologia In: MANDIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (Ed.). **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Pearson, 2008. p. 216-246.

MCGRATH, S.; FITZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. van. Starter Cultures: Bacteriophage. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. V. 1, General Aspects, p. 163-189.

MIKLIC, A.; ROGELJ, I. Characterization of lactococcal bacteriophages isolated from Slovenian dairies. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, p. 305–311, 2003.

MOINEAU, S.; BORKAEV, M.; HOLLER, B. J.; WALKER, S. A.; KONDO, J. K.; VEDAMUTHU, E. R.; VANDENBERGH, P. A. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. **Journal of Dairy**

Science, v. 79, p. 2104-2111, 1996.

MÜLLER-MERBACH, M.; KOHLER, K; HINRICHS, J. Environmental factors for phage-induced fermentation problems: replication and adsorption of the *Lactococcus lactis* phage P008 as influenced by temperature and pH. **Food Microbiology**, v. 24, p. 695-702, 2007.

NEVE, H.; TEUBER, M. Basic microbiology, and molecular biology of bacteriophage of lactic acid bacteria in dairies. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 263, p. 3-15, 1991.

QUIBERONI, A.; AUAD, L.; BINETTI, A.G.; SUÁREZ, V.B.; REINHEIMER, J.A.; RAYA, R.R. Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from a yogurt industrial plant. **Food Microbiology**, v.20, p. 461-469, 2003.

SCHOULER, C. Genomic organization of lactic acid bacteria phages. **Lait**, v. 76, p.81-89, 1996.

SUÁREZ, V.; MOINEAU, S.; REINHEIMER, J.; QUIBERONI, A. Argentinean *Lactococcus lactis* bacteriophages: genetic characterization and adsorption studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 371–379, 2008.

SUÁREZ, V. B.; QUIBERONI, A.; BINETTI, A. G.; REINHEIMER, A. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 10, p. 1597-1604, 2002.

SVENSSON, U.; CHRISTIANSSON, A. Methods for phage monitoring. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 263, p. 29-39, 1991.

VILLION, M.; CHOPIN, M-C.; DEVEAU, H.; EHRLICH, S.D.; MOINEAU, S.; CHOPIN, A. P087, a lactococcal phage with a morphogenesis module similar to an Enterococcus faecalis prophage . **Virology**, v.388, p. 49-56, 2009.

VILLION, M.; MOINEAU, S. Bacteriophages of Lactobacillus. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 1661–1683, 2009.



Agroindústria Tropical

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

